

07303482 A(19) (11) Publication number: 07303482 A

Generated Document.

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(21) Application number: 07109884

(51) Intl. Cl.: C12N 9/64 C07K 16/30 C07K 16/32 C07K 16/40 C12N 1/21
C12N 15/09 C12P 21/08 G01N 33/53 G01N 33/573 G01N 33/574 G01N 33/577

(22) Application date: 31.03.95

(30) Priority: 30.11.93 JP 05341061

(43) Date of application publication: 21.11.95

(84) Designated contracting states:

(71) Applicant: FUJI YAKUHHIN KOGYO KK

(72) Inventor: SEIKI MOTOHARU
SATO HIROSHI
SHINAGAWA AKIRA

(74) Representative:

(54) NEW METALLOPROTEASE AND DNA CODING THE SAME

(57) Abstract:

PURPOSE: To obtain a protein having a specific amino acid sequence, and useful for physiological degradation and medical applications such as diagnosing cancerous cell presence/absence and cancer malignancy.

CONSTITUTION: This protein has an amino acid sequence of the formula, and is obtained by culturing a host cell having a plasmid containing a DNA coding this protein and capable of manifesting this protein. It is preferable that a monoclonal antibody be obtained by using this protein (the objective new matrix metalloprotease) as immunogen.

COPYRIGHT: (C)1995,JPO

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平7-303482

(43)公開日 平成7年(1995)11月21日

(51)Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 9/64	Z			
C 0 7 K 16/30		8318-4H		
16/32		8318-4H		
16/40		8318-4H		
		9281-4B	C 1 2 N 15/ 00	Z N A A
審査請求 未請求 請求項の数5 書面 (全 28 頁) 最終頁に続く				

(21)出願番号 特願平7-109884
(62)分割の表示 特願平6-331305の分割
(22)出願日 平成6年(1994)11月30日

(31)優先権主張番号 特願平5-341061
(32)優先日 平5(1993)11月30日
(33)優先権主張国 日本 (J P)

(71)出願人 390010205
富士薬品工業株式会社
富山県高岡市長慶寺530番地
(72)発明者 清木 元治
石川県金沢市涌波3丁目10番14号
(72)発明者 佐藤 博
石川県金沢市平和町3丁目18番15号 平和
宿舎C57-11
(72)発明者 品川 朗
富山県高岡市長慶寺530番地 富士薬品工
業株式会社内
(74)代理人 弁理士 川上 宜男

(54)【発明の名称】 新規なメタロプロテアーゼおよびそれをコードするDNA

(57)【要約】

【構成】 新規なメタロプロテアーゼ、それをコードするDNA、そのDNA配列を有するプラスミドおよびそのプラスミドを有する宿主細胞ならびにそのタンパク質に特異的に結合するモノクローナル抗体。

【効果】 癌細胞の存在の有無、癌の悪性度の診断等の医学的、生理学的分野の用途に有用である。

1

【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列表配列番号1に示されているアミノ酸配列を有するタンパク質。

【請求項2】 配列表配列番号1に示されているアミノ酸配列を有するタンパク質をコードする配列表配列番号2に示されている塩基配列を有するDNA。

【請求項3】 配列表配列番号2に示されている塩基配列を有するDNA配列を含有し、配列表配列番号1に示されているタンパク質を発現するプラスミド。

【請求項4】 配列表配列番号2に示されている塩基配列を有するDNA配列を含有し、配列表配列番号1に示されているタンパク質を発現するプラスミドを有する宿主細胞。

【請求項5】 配列表配列番号1に示されているアミノ酸配列を有するタンパク質を特異的に認識するモノクローナル抗体。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【技術分野】 本発明は、癌細胞の存在の有無、癌の悪性度の診断等に、あるいはその他の医学的、生理学的分野の用途に有用な新規なメタロプロテアーゼに関する。

【0002】 さらに詳しく言えば、本発明はヒト癌細胞で特異的に発現しているメタロプロテアーゼの1種ならびにそれをコードする遺伝子DNA配列、そのDNA配列を含有する塩基配列を有するプラスミド、そのプラスミドを有する宿主細胞、該宿主細胞を用いる該タンパク質の製造方法、前記DNA配列とハイブリダイズするプローブ、該プローブを用いる前記DNA配列を有するDNAまたはRNAの検出方法、前記のタンパク質に特異的に結合するモノクローナル抗体に関するものである。

【0003】

【背景技術】 コラーゲン、プロテオグリカン、エラスチン、フィブロネクチン、ラミニン等の複雑な成分から構成される細胞外マトリックスの分解には、基質特異性を異にするマトリックスメタロプロテアーゼと総称される一群の酵素（以下MMPsと略記する）が関与している。

【0004】 これまでMMPsとしては、間質型コラーゲナーゼ（MMP-1）、72kDaゼラチナーゼ（IV型コラーゲナーゼあるいはゼラチナーゼAともいう：MMP-2）、92kDaゼラチナーゼ（IV型コラーゲナーゼあるいはゼラチナーゼBともいう：MMP-9）、ストロムライシン-1（MMP-3）、マトリライシン（MMP-7）、好中球コラーゲナーゼ（MMP-8）、ストロムライシン-2（MMP-10）、ストロムライシン-3（MMP-11）等が報告されている。

【0005】 これらのMMPsはファミリーを形成し、遺伝子の一次構造は既に報告されている。決定されているMMPsファミリー間の一次構造においては、MMP-7を除き各MMPは基本的にN-末端プロペプチド

2

メイン、Zn²⁺結合触媒ドメイン、C-末端ヘモベキシン凝血酵素様ドメインの3つから構成されている。MMP-7においてはヘモベキシン凝血酵素様ドメインはない。MMP-2とMMP-9では、この他にゼラチン結合ドメインを含んでいる。さらに、MMP-9では、Zn²⁺結合触媒ドメインとC-末端ヘモベキシン凝血酵素様ドメインの間にプロリンに富むV型コラーゲン $\alpha 2$ 鎖と相同性の高いドメインが挿入されている。

【0006】 転移性の高い癌細胞では、IV型コラーゲンを主たる基質とするIV型コラーゲナーゼ（MMP-2、MMP-9）の顕著な発現が見られることが報告されており（*キャンサー リサーチ (Cancer Res.)*、第46巻、1～7頁（1986）；*バイオケミカル アンド バイオフィジカル リサーチ コミュニケーションズ (Biochem. Biophys. Res. Commun.)*、第154巻、832～838頁（1988）；*キャンサー (Cancer)*、第71巻、1368～1383頁（1993））、また、MMP-9の活性化がMMP-3の作用によって引き起こされることが報告されている（*ザ ジャーナルオブ バイオロジカル ケミストリー (J. Biol. Chem.)* 第267巻、3581～3584頁（1992））。マトリックスメタロプロテアーゼの発現の程度は、癌の悪性度を診断する指標となる。

【0007】

【発明の開示】 本発明者らは新規なマトリックスメタロプロテアーゼ（以下本明細書においてはMT-MMPと記述する）を見出し、その構造分析を行った。本発明により、下記に記載されるとおり、新規なメタロプロテアーゼタンパク質、そのタンパク質をコードする塩基配列を有するDNA、このDNA塩基配列を有するプラスミド、このプラスミドを有する宿主細胞ならびに上記メタロプロテアーゼタンパク質を特異的に認識するモノクローナル抗体が提供される。

【0008】 1. 配列表配列番号1に示されているアミノ酸配列を有するタンパク質。

2. 配列表配列番号1に示されているアミノ酸配列を有するタンパク質をコードする配列表配列番号2に示されている塩基配列を有するDNA。

3. 配列表配列番号2に示されている塩基配列を有するDNA配列を含有し、配列表配列番号1に示されているタンパク質を発現するプラスミド。

4. 配列表配列番号2に示されている塩基配列を有するDNA配列を含有し、配列表配列番号1に示されているタンパク質を発現するプラスミドを有する宿主細胞。

5. 配列表配列番号1に示されているアミノ酸配列を有するタンパク質を特異的に認識するモノクローナル抗体。

【0009】 以下に、本発明を詳細に説明する。本発明者らは、公知のマトリックスメタロプロテアーゼ（MM

P) ファミリーのアミノ酸配列から選択した高度に保存されている配列(配列表配列番号3および4)より、配列表配列番号5および6に記載した配列を有するオリゴヌクレオチドプライマーを設計、合成した。該オリゴヌクレオチドプライマーとヒト胎盤cDNAライブラリーを用い、PCR反応を行い、得られたPCR産物の各DNAの塩基配列を決定し、公知のMMPと相同でない配列を有する390b. p. のDNA断片を得た。この390b. p. DNA断片をプローブとし、ヒト胎盤cDNAライブラリーのスクリーニングを行い、得られた陽性クローンのファージDNA中に組み込まれていたcDNAの塩基配列を決定した。塩基配列は配列表配列番号2に記載の塩基配列である。配列表配列番号2に記載の塩基配列と同一の配列は、GENBANK/EMBL DNA Data Base中には存在せず、この塩基配列を有するDNAは全く新規なものであることが認められた。

【0010】配列表配列番号2に記載した上記のクローンのcDNAの塩基配列は、3'非翻訳配列と共に推定582アミノ酸残基のオープンリーディングフレームを有していた。開始コドンは塩基番号112に位置し、停止コドンは塩基番号1858に存在する。このオープンリーディングフレームは、配列表配列番号1に記載した582アミノ酸からなる配列をコードしており、開始コドンのすぐ下流から推定されるシグナル配列が続き、C末端のアミノ酸番号533から562に20個以上の疎水性アミノ酸の連続した膜結合型タンパク質に特徴的な疎水性領域(配列表配列番号7)が存在することが認められた。

【0011】図2に示すようにMT-MMPのアミノ酸配列と公知のMMPファミリーのアミノ酸配列との相同性を調査した結果、MT-MMPは公知のMMPファミリーと高い相同性を示した。MMPファミリーで保存されている前駆体と成熟体のプロセッシング部位近傍の配列、および活性部位の配列はMT-MMP中で最も良好に保存されていた。またMT-MMPでは、他のMMPファミリーのアミノ酸配列上には認められない配列表配列番号7に示した疎水性アミノ酸の連続した配列が存在し、膜貫通型タンパク質の構造的特徴を有することから、他のMMPファミリーとは異なる膜結合型のMMPであることが強く示唆された。

【0012】MT-MMPのヒト組織中での発現を各種の組織由来Poly(A)RNAに対するノーザンブロット分析により検討した結果、胎盤、肺、腎臓で高い発現をしていることが認められた(図3参照)。また、ヒト肺扁平上皮癌の正常部分および癌部分から抽出したRNAに対しノーザンブロット分析を行った結果、MT-MMPは癌部位で特異的に発現していることが認められた(図4参照)。なお、本発明のMT-MMPは、抗MT-MMPモノクローナル抗体を用いた免疫沈降や免疫

染色実験により遺伝子産物が分泌されることなく細胞膜上に発現されていることが示され、また、MT-MMP遺伝子をトランスフェクションした細胞では、MT-MMPの発現に依存したMMP-2の活性化が観察された(ネイチャー(Nature)、第370巻、61~65頁(1994))。以上述べた本発明者らの研究成果により、本発明により、配列表配列番号1に記載されたアミノ酸配列を有する新規なマトリックスメタロプロテアーゼタンパク質が提供される。

【0013】また、本発明により配列表配列番号1に記載されたアミノ酸配列を有するタンパク質をコードしている配列表配列番号2に記載された塩基配列を有するDNA、該DNAを有し発現し得るプラスミド、このプラスミドを有する宿主細胞が提供される。上記の宿主細胞としては、大腸菌、枯草菌などの原核細胞宿主、酵母、COS細胞、CHO細胞、3T3細胞などの真核細胞、Sf21などの昆虫細胞等、通常遺伝子組換え技術で用いられる全ての宿主細胞を用いることができる。上記のプラスミドとしては、通常用いられる宿主細胞に応じた発現ベクターを用いることができる。

【0014】さらに本発明により、配列表配列番号2に記載された塩基配列を有するDNAから転写されるmRNAが提供される。上記のDNAあるいはRNAとハイブリダイズし、該DNAまたはRNAを特異的に検出するプローブも提供されるが、該プローブは、通常使用される放射性同位元素、酵素などにより標識され、通常のブロッティング分析、In situハイブリダイゼーションで該DNAあるいはRNAと特異的にハイブリダイズし、検出できるものであれば配列表配列番号2に記載した塩基配列の一部を有するものであればよく、どのような塩基配列でもよい。

【0015】さらに、本発明は、本発明に係るMT-MMPと特異的に結合するモノクローナル抗体を提供する。本発明に係るモノクローナル抗体は、ヒトMT-MMPを免疫原として公知の方法、例えばミルシュタインらの方法(ネイチャー(Nature)、第256巻、495~497頁(1975))により製造することができる。この方法において、免疫原としては天然型ヒトMT-MMP、組換えヒトMT-MMPおよびそれらの一部のアミノ酸配列を有する合成ペプチド等の何れでもよい。

【0016】本発明により、本発明に係る新規なMT-MMPのアミノ酸配列を有するタンパク質をコードする塩基配列を有するDNAをクローン化し、そのDNAおよびそのDNAにコードされているタンパク質を遺伝子工学的的方法により製造することができる。この新規なMT-MMPのcDNAクローンを用いることにより、上記の塩基配列を遺伝子工学的に常用される方法を用いて他のベクターあるいは宿主へのクローン化を行うことができる。また、上記のcDNAの塩基配列に準拠して適

宜、プローブに適したDNAを設計し、調製することができる。さらに、本発明に係わるMT-MMPの遺伝子塩基配列をもとに遺伝子工学的に常用される方法を用いることにより、MT-MMPのアミノ酸配列中に適宜、1個ないしは複数個以上のアミノ酸の置換、欠失、挿入、転移あるいは付加した如き変異を導入した相当するタンパク質を製造することができる。メタロプロテアーゼの共通の特徴である前駆体と成熟体のプロセッシング部位近傍の配列や活性部位の配列、ドメイン構造、MT-MMPの特徴であるC末端近傍に存在する疎水性アミノ酸の連続した疎水性領域が維持されていれば、上記の如き誘導体は全て本発明に包含される。

【0017】本発明の前述した種々の態様を利用することにより、癌細胞の存在の有無、癌の悪性度などの診断用の診断剤あるいは診断方法の用途に、あるいはまた、その他の医学的生理学的分野の用途に適用される種々の技術手段を提供することができる。以下、実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明は、これら実施例により限定されるものではない。

【0018】

【実施例】

実施例1

新規なメタロプロテアーゼ (MT-MMP) cDNAの単離

(a) cDNAライブラリーの構築

ヒト胎盤組織から全RNAをグアニジン塩化セシウム法 (バイオケミストリー (Biochemistry)、第18巻、5294~5299頁 (1979)) により抽出し、ポリ (A) + RNAをオリゴ (dT) - セルロースカラムを使用して精製した。精製したポリ (A) + RNAをテンプレート、オリゴ (dT) をプライマーとしてガブリエル・ホフマン (Gubler・Hoffman) 法 (ジーン (Gene)、第25巻、263~269頁 (1983)) に従い、cDNAを合成した。T₄ DNAポリメラーゼによりcDNAの末端を平滑化した後、EcoR IメチラーゼによりcDNA中に存在するEcoR Iサイトをメチル化した。さらにEcoR Iリンカー [d (PG-G-A-A-T-T-C-C)] とcDNAをT₄ DNAリガーゼを用い連結させた後、EcoR I消化することにより両末端にEcoR Iサイトを有するcDNAを構築した。このcDNAをλgt11のEcoR IサイトにT₄ DNAリガーゼを用い連結させた。次にこのcDNAを例えばインビトロパッケージングキット (Amersham) を使用し、インビトロパッケージングを行い、cDNAライブラリーを構築した。cDNAライブラリーとして市販の例えばヒト胎盤cDNAライブラリー (CLONTECH) を使用することもできる。

【0019】(b) 合成オリゴヌクレオチドプライマーの作製

既知のMMPsファミリーのアミノ酸配列の中から、MMPsファミリー中で高度に保存されているアミノ酸配列として配列表配列番号3 (P-1) および配列番号4に記載した配列 (P-2) を選択した。このオリゴペプチドP-1およびオリゴペプチドP-2のそれぞれに対応するオリゴデオキシヌクレオチドプライマーを設計した。すなわち、オリゴペプチド中に2つ以上のコドンでコードされるアミノ酸が存在する場合その混合物とし配列表配列番号5 (プライマー1) および配列番号6 (プライマー2) に記載した配列のごとく設計した。このプライマー1およびプライマー2をDNAシンセサイザModel 392 (Applied Biosystems) を使用し、β-シアノエチルフォスホアミド (β-cyanoethyl phosphoamide) 法により合成した。得られたプライマー1およびプライマー2は10mMリン酸ナトリウム緩衝液pH6.8で平衡化したニックカラム (Pharmacia) を用い精製した。

【0020】(c) PCRによる遺伝子増幅

ヒト胎盤由来のcDNAをテンプレート、前項 (b) に記載したプライマー1およびプライマー2をプライマーとしてPCR反応 (PCRテクノロジー (PCR Technology) 63~67頁、ストックトンプレス (Stockton Press)) を行った。その結果、390b.p. のPCR産物を得た。得られたPCR産物を適当なプラスミド、例えばpUC 119やpBluescriptにクローニングし、このPCR産物の塩基配列を、蛍光DNAシーケンサModel 373A (Applied Biosystems)、Taqダイプライマーサイクルシーケンシングキット (Applied Biosystems) を使用し決定した。塩基配列を決定した種々のPCR産物の中から既知MMPの塩基配列と相同性のないPCR産物Aを得た。このPCR産物Aを前述の (a) 項に記載したヒト胎盤組織cDNAライブラリーをスクリーニングするためのプローブとして用いた。プローブの³²P標識は、ランダムプライムDNAラベリングキット (Boehringer Mannheim) を使用して行った。

【0021】(d) cDNAライブラリーからの新規MMP遺伝子のスクリーニングと塩基配列の決定

前述の (a) に記載したλgt11中に構築したヒト胎盤cDNAライブラリーを宿主菌大腸菌Y1090に感染させ、プラークを形成させた。すなわち、Y1090株を0.02%マルトースを含むL培地で1晩培養後、集菌し、10mMMgSO₄に懸濁した。この細胞懸濁液とファージ液を混合し37℃15分間インキュベートし、ファージを宿主菌に吸着させた。これに軟寒天を加え、Lプレート上に広げた (上記の操作を以後プレーティングと称す)。プレートを42℃で1晩インキュベートし、プラークを形成させた後、ナイロンフィルター

7

(例えば、ハイボンド-N (Amersham)) あるいはニトロセルロースフィルター (例えばHATF (Millipore)) をプレート上に置き、約30秒間放置した。膜を穏やかに剥がしアルカリ変性液 (0.1 M NaOH, 1.5 M NaCl) に30秒間浸した後、中和液 (1.5 M NaCl含有0.5 M Tris-HCl緩衝液, pH8) に5分間浸した。このフィルターを2×SSPE (0.36 M NaCl, 20 mM NaH₂PO₄, 2 mM EDTA) で洗浄した後、風乾した。上述のブランクのフィルターへの転写を繰り返し、少なくとも2枚のフィルターを調製した。但し、2枚目以降のフィルターとプレートの接触時間は2分間程度に延長した。このフィルターを80℃で2時間ベーキングし、DNAを固定した。1つのプレートから調製した少なくとも2枚のフィルターをそれぞれ42℃、1時間洗浄液 (1 M NaCl, 1 mM EDTAおよび0.1% SDS含有50 mM Tris-HCl緩衝液, pH8.0) で洗浄後、ハイブリダイゼーションバッグ中にフィルターを入れ、プレハイブリダイゼーション溶液 (50% formamide, 5×Denhardt's 溶液 (0.2% ウシ血清アルブミン, 0.2% polyvinylpyrrolidone), 5×SSPE, 0.1% SDS, 100 μg/ml 熱変性サケ精子DNA) に浸し、42℃で6~8時間プレハイブリダイゼーションを行った。次に100℃、5分間加熱変性させた (c) 項で記載した³²P 標識プローブをプレハイブリダイゼーション溶液に添加し、42℃で1晩ハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーション完了後、フィルターを室温で多量の0.1% SDS含有2×SSC溶液で洗浄した。次にフィルターを0.1% SDS含有1×SSC溶液中に68℃、15分間置いた。このフィルターを風乾した後、X線フィルム (Kodak XR) と重ね70℃で1週間オートラジオグラフィを行った。X線フィルムを現像し、1枚のプレートからできた2枚のフィルムを重ね、重なるシグナルをマークした。マークしたシグナルに相当するブランクをSM溶液 (100 mM NaClおよび10 mM MgSO₄含有50 mM Tris-HCl緩衝液, pH7.5) に懸濁した。このファージ懸濁液を適度に希釈してプレーティングし、上記と同様のスクリーニングを行い、組換え体ファージを得た。

【0022】(e) 組換え体λgt11 DNAの調製
クローン化したファージをそれぞれプレーティングし42℃、3時間インキュベートし、続いて37℃、1晩インキュベートした後SM溶液に数滴のクロロホルムを加え室温で30分間放置した。SM溶液と共に上層の軟寒天を掻き取り、遠心分離した。遠心後の上清に終濃度10%になるようにポリエチレングリコールを加え攪拌した後、4℃で1時間放置した。これを遠心分離し上清を捨て、ファージ粒子を回収した。このファージ粒子をS

8

M溶液に懸濁し、グリセロールグラジエント超遠心分離法 (モレキュラークロニング、ア ラボラトリーマニュアル (Molecular cloning, a laboratory manual), T. マニアスチス (T. Maniatis) 他著、コールド スプリングハーバー ラボラトリープレス (Cold Spring Harbor Laboratory Press) 発行、2. 78頁 (1989)) により精製した。得られたファージをTM溶液に懸濁し、DNase IおよびRNase Aで処理後、20 mM EDTA, 50 μg/ml Proteinase Kおよび0.5% SDSの混合液を加え65℃、1時間インキュベートした。これをフェノール抽出、ジエチルエーテル抽出後、エタノール沈殿によりDNAを沈殿させた。得られたDNAを70%エタノールで洗浄後乾燥し、TE溶液 (10 mM EDTA含有10 mM Tris-HCl緩衝液, pH8) に溶解した。

【0023】(f) 挿入断片の塩基配列決定

前項(e)で調製したλgt11 DNをEcoR Iで分解し、挿入断片を分離精製後、ベクターpBluescript (Stratagene) のEcoR I部位にクローニングした。この組換え体pBluescriptで大腸菌NM522XL1-Blueを形質転換した。形質転換細胞をF' 選択後、ヘルパーファージVCSM13 (Stratagene) を感染させ終夜培養した。培養液を遠心分離し菌体を除き、これにPEG/NaClを加えファージを沈殿させた。沈殿をTE溶液に懸濁後、1本鎖DNAをフェノール抽出、エタノール沈殿により回収した。この1本鎖DNAの塩基配列を蛍光DNAシーケンサModel 373A (Applied Biosystems)、Taqダイブイマーサイクルシーケンシングキット (Applied Biosystems) を使用し決定した。決定した塩基配列の全長は3403塩基対であり、その配列は配列表配列番号2に記載した。GENBANK/EMBL DNA DataBaseを使用し、配列表配列番号2に記載した塩基配列を検索したが、同一の配列は存在しなかった。

【0024】(g) 遺伝子産物の解析

配列表配列番号2に記載した遺伝子塩基配列から予想される配列表配列番号1に記載したアミノ酸配列の親水、疎水性値をカイト・ドール (Kyte・Doolittle) 法 (ジャーナル オブ モレキュラーバイロジ (J. Mol. Biol.), 第157巻、105~132頁 (1982)) により算出し、図1に示す親水性、疎水性分布図を決定した。配列表配列番号1のアミノ酸533位から562位のC末端領域に膜結合型タンパク質に特徴的な20個以上の疎水性アミノ酸が連続する配列からなる疎水性領域が存在し、その配列を配列表配列番号7に示した。このような疎水性のアミノ酸

が連続している配列は、既知のMMPsには見られない配列である。配列表配列番号1に記載したアミノ酸配列を公知のMMPsのアミノ酸配列とその相同性を比較した結果、配列表配列番号1に示したアミノ酸配列は、MMPsファミリーと相同性を示した。特に、MMPsファミリーで非常に高度に保存されている前駆体と活性型の切断部位および活性部位はMT-MMPでもそれぞれ高い保存性を示した(配列表配列番号1、アミノ酸88位~97位およびアミノ酸番号112位~222位)。

【0025】実施例2 遺伝子発現

(a) 組織での発現

ヒト心臓、脳、胎盤、肺、肝臓、骨格筋、腎臓、脾臓、各組織由来のポリ(A)⁺RNAをプロットしてあるメンブレン ヒューマン マルチプル ティッシュ ノーザン プロッツ (CLONTECH) に対し、³²P 標識した実施例1(c)項に記載したPCR産物Aをプローブとして用いてハイブリダイゼーションを行った。3×SSC (0.45M NaCl, 0.045M trisodium citrate-2H₂O, pH7.0) で湿らせたヒューマン マルチプル ティッシュノーザン プロッツのフィルターをプレハイブリダイゼーション溶液 (0.75M NaCl, 2.5mMEDTA, 0.5×Denhardt, s 溶液, 50%Formamide および1%SDS含有20mM Tris-HCl 緩衝液, pH7.5) 中で穏やかに攪拌しながら2~3時間プレハイブリダイズした。次にハイブリダイゼーション溶液 (プレハイブリダイゼーション溶液に10% Sodium Dextran, 50μg/ml 変性サケ精子DNAを加えた溶液) に熱変性したプローブを加えプレハイブリダイゼーション溶液と交換し、43℃で1晩ハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーション完了後、0.1% SDS含有2×SSC溶液で洗浄した。次にフィルターを0.1% SDS含有1×SSC溶液中に68℃、15分間置いた。このフィルターを風乾した後、X線フィルム (Kodak XR) と重ね70℃で1週間オートラジオグラフィーを行った。MT-MMP遺伝子の転写産物のサイズは、何れの組織でも4.8kbであった。現像したX線フィルムをデンストメーターでトレースシグナルの強度を測定した結果、MT-MMP遺伝子は、調べた組織中、肺、胎盤、腎臓で高い発現を認めた。

【0026】(b) 癌組織での発現

ヒト肺癌2例それぞれから正常組織と癌組織を採取し、全RNAをグアニジン-塩化セシウム法により抽出した。10μgの該RNAそれぞれを1%アガロース電気泳動後、ナイロンメンブレンにトランスファーし、実施例1(c)項に記載した³²P 標識したプローブを使用してハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーションおよびオートラジオグラフィーのトレースは前項(a)と同様に行った。いずれのヒト肺癌

上皮癌においても癌組織(図4 T参照)での発現が正常組織(図4 N参照)に比べ有意に高値を示した。

【0027】実施例3 モノクローナル抗体の調製

(a) 抗原ポリペプチドの調製

配列表配列番号1に記載したMT-MMPのアミノ酸配列中より他のMMPファミリーとの相同性が低い特異的な配列として配列表配列番号8(配列表配列番号1アミノ酸番号160位~173位の配列)、同9(配列表配列番号1アミノ酸番号320位~333位の配列)および同10(配列表配列番号1アミノ酸番号498位~512位の配列)に記載した配列(以下それぞれポリペプチドA、ポリペプチドBおよびポリペプチドCと略記する)を選択した。これらのポリペプチドをペプチド合成機(ペプチドシンセサイザー9600, Milligen/Bioscience)を用いFmoc-BOP法により合成し、N末端にシステインを導入した。合成した各ペプチドは高速液体クロマトグラフィーにより精製した。

【0028】(b) 各ポリペプチドとキーホールリンベットヘモシアニンの複合体の調製

2mgキーホールリンベットヘモシアニン(KLH)を1mlの0.1Mリン酸緩衝液(pH7.5)に溶解したものと1.85mgN-(ε-maleimidocaproxy) succinimideを200μlのジメチルホルムアミドに溶解したものと混合し、30℃、30分間反応させた。ついで、上記の混合液を0.1Mリン酸緩衝液(pH7.0)で平衡化したPD-10(Pharmacia)でゲルろ過した。マレイミドが結合したKLHを分取し、1.5ml以下に濃縮した。マレイミドが結合したKLHに対し50倍モル量の前記(a)で合成した各ポリペプチドを1mlの0.1Mリン酸緩衝液(pH7.0)に溶解したものとをそれぞれ混合し、4℃、20時間インキュベートし、KLH-ポリペプチド複合体を調製した。

【0029】(c) 抗体産生細胞の調製

前項(b)で調製した3種類のポリペプチドA、ポリペプチドBおよびポリペプチドCとKLHとの複合体それぞれ250μgを完全フロインドアジュバントと共に8週令Balb/c雌マウスに腹腔内投与し、初回免疫した。18日後に0.1Mリン酸緩衝液(pH7.5)に溶解した各複合体200μgをそれぞれの初回免疫したマウスに腹腔内投与し、追加免疫した。さらに32日後に追加免疫時と同様に各複合体100μgを静脈内投与し、最終免疫とした。その3日後に脾臓を摘出し、脾細胞懸濁液を調製した。

【0030】(d) 細胞融合

8-アザグアニン耐性ミエロマ細胞SP2(SP2/O-Ag14)との融合は、オイ(Oi)らの方法(Selected Method in Cellular

Immunology)、B. B. ミッシェルとS. M. シーギ編(ed. B. B. Mishell and S. M. Shilg)、W. H. フリーマン アンドカンパニー(W. H. Freeman and Company)発行、351~372頁(1980))を若干改変して行った。以下では、ポリペプチドA-KLH複合体で免疫したマウス由来の有核脾細胞とミエローマ細胞SP2との融合に関して詳述する。

【0031】前項(c)で調製した有核脾細胞(生細胞率100%)それぞれとミエローマ細胞(生細胞率100%)をと5:1の比率で以下の手順で融合した。ポリペプチドA脾細胞懸濁液とミエローマ細胞をそれぞれRPMI 1640培地で洗浄した。次に同じ培地に懸濁し、融合させるために有核脾細胞 3×10^8 個とミエローマ細胞 6×10^7 個を混合した。次に遠心分離により細胞を沈殿させ、上清を完全に吸引除去した。沈殿した細胞に37℃に加温したPEG 4000溶液(50% (w/v) ポリエチレングリコール4000含有RPMI 1640培地) 2.0mlを1分間で滴下し、1分間攪拌し、細胞を再懸濁、分散させた。次に37℃に加温したRPMI 1640培地2.0mlを1分間で滴下した。この操作をさらに1回繰り返した後、同培地14mlを2~3分間で常に攪拌しながら滴下し、細胞を分散させた。これを遠心分離し、上清を完全に吸引除去した。次にこの沈殿した細胞に37℃に加温したNS-1培地(除菌ろ過した15% (w/v) 仔牛胎児血清(JRH Biosciences)含有RPMI 1640培地) 30mlを速やかに加え、大きい細胞塊を注意深くピペettingで分散した。さらに同培地30mlを加えて希釈し、ポリスチレン製96穴マイクロウェルにウェル当り 6.0×10^5 個/0.1mlの細胞を加えた。細胞を加えた上記マイクロウェルを7%炭酸ガス/93%空気中で温度37℃、湿度100%で培養した。

【0032】ポリペプチドB-KLH複合体で免疫したマウス由来脾細胞の場合では、脾細胞 6.4×10^8 個とミエローマ細胞 1.28×10^8 個を混合し、上記で使用するPEG 4000溶液、RPMI 1640培地、NS-1培地をそれぞれ4.3ml、38.7ml、129ml用いた。ポリペプチドC-KLH複合体で免疫したマウス由来の脾細胞の場合、脾細胞 6.8×10^8 個とミエローマ細胞 1.36×10^8 個を混合し、PEG 4000溶液、RPMI 1640培地、NS-1培地をそれぞれ4.5ml、40.5ml、135ml使用した。

【0033】(e) 選択培地によるハイブリドーマの選択的増殖

前項(d)の培養開始後翌日(1日目)、細胞にパスツールピペットでHAT培地(NS-1培地にヒポキサンチン(100μM)、アミノプテリン(0.4μM)およびチミジン(16μM)を加えた培地)2滴(約0.

1ml)を加えた。2、3、5、8日目に培地の半分(約0.1ml)を新しいHAT培地で置き換え、11日目に培地の半分を新しいHT培地(アミノプテリン不含HAT培地)で置き換えた。14日目にハイブリドーマの生育が肉眼にて認められた全ウェルについて固相-抗体結合テスト法(ELISA)により陽性ウェルを調べた。すなわち、ポリスチレン性96穴プレートに抗原としたポリペプチドA、BおよびCそれぞれでコートし、次に洗浄用PBS(0.05% Tween 20含有)を用いて洗浄して未吸着のペプチドを除いた。さらに各ウェルの未コート部分を1%BSAでブロックした。この各ウェルにハイブリドーマの生育が確認されたウェルの上清0.1mlを添加し、室温で約1時間静置した。2次抗体として西洋わさびペルオキシダーゼ標識ヤギ抗マウス免疫グロブリンを加え、さらに室温で約1時間静置した。次に基質である過酸化水素とo-フェニレンジアミンを加え、発色の程度をマイクロプレート用吸光度測定機(MRP-A4、東ソー)を用いて492nmの吸光度で測定した。

【0034】(f) ハイブリドーマのクローニング

前項(e)で得られた各抗原ペプチドに対する陽性ウェル中のハイブリドーマを、限界希釈法を用いてモノクローナ化した。すなわち、96穴マイクロウェルにハイブリドーマをウェル当り5個、1個、0.5個になるように希釈し、それぞれ36穴、36穴、24穴に加えた。5日目、12日目に全ウェルに約0.1mlのNS-1培地を追加した。クローニング開始後約2週間で、肉眼的に十分なハイブリドーマの生育を認め、コロニー形成陰性ウェルが50%以上である群について(e)に記載したELISAを行った。調べた全ウェルが陽性でない場合、抗体陽性ウェル中のコロニー数が1個のウェルを4~6個選択し、再クローニングを行った。最終的に表1および表2にまとめて示したように各ポリペプチドA、ポリペプチドBまたはポリペプチドCに対するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマがそれぞれ12個、20個、9個得られた。

【0035】(g) ハイブリドーマの培養とモノクローナル抗体の精製

得られた各ハイブリドーマ細胞をNS-1培地で培養し、その上清から濃度10~100μg/mlのモノクローナル抗体を得ることができた。また、得られたハイブリドーマを 10^7 個を予め1週間前にプリスタンで腹腔内投与したマウス(BALB/C系、雌、6週齢)に同じく腹腔内投与し、1~2週間後、腹水中からも4~7mg/mlのモノクローナル抗体を含む腹水を得ることができた。得られた腹水を40%飽和硫酸アンモニウムで塩析後、IgGクラスの抗体をプロテインAアフィニティゲル(Bio-Rad)に吸着させ、0.1Mクエン酸緩衝液(pH5)で溶出することにより精製した。

【0036】(h) モノクローナル抗体のクラス、サブ

クラスの決定

前述したELISAに従い、各ポリペプチドA、ポリペプチドBまたはポリペプチドCをコートしたマイクロタイトレーションプレートに、(f)で得られたモノクローンの上清を加えた。次にPBSで洗浄後、アイソタイプ特異的ウサギ抗マウスIgG抗体(Zymed Lab.)を加えた。PBSにより洗浄後、西洋わさびペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ウサギIgG(H+L)を加え、基質として過酸化水素および2, 2'-アジノージ(3-エチルベンゾチアゾリン酸)を用いてクラス、サブ

10 クラスを決定した。
 【0037】(1)抗MT-MMPモノクローナル抗体の特異性
 ヒト新生児線維芽細胞(NB1RGB)の培養上清中からそれぞれ精製した潜在型MMP-1(クリニカ キミカ アクタ(Clin. Chim. Acta)、第219巻、1~14頁(1993))、潜在型MMP-2(クリニカ キミカ アクタ(Clin. Chim. Acta)、第221巻、91~103頁(1993))および潜在型MMP-3(クリニカ キミカ アクタ 20 (Clin. Chim. Acta)、第211巻、59~72頁(1992))、ヒト直腸癌細胞(Car-1)の培養上清から精製した潜在型MMP-7(キャンサー リサーチ(Cancer Res.)、第50巻、7758~7764頁、(1990))、ヒト好中球より精製した潜在型MMP-8(バイオロジカル ケミストリー ホップ セイラー(Biol. Chem. Hoppe-Seyler)、第371巻、サブメント、295~304頁、(1990))並びにヒト線維芽細胞腫株(HT1080)の培養上清から精製した潜 30 在型MMP-9(ザジャーナル オブ バイオロジカル ケミストリー(J. Biol. Chem)、第267巻、21712~21719頁、(1992))をそれぞれ抗原として使用し、前述の(e)に記載したELISAによりヒトMT-MMPペプチドと陽性反応を示す5種類の抗MT-MMPモノクローナル抗体(モノクローン番号113-5B7、113-15E7、114-1F1、114-2F2および118-3B1)の交差反応性を調べた。

【0038】すなわち、ポリスチレン製96穴プレート 40 を使用し、各ウェルに精製した各MMP-1、MMP-2、MMP-3、MMP-7、MMP-8およびMMP-9をそれぞれ50ng/wellで加えコートした。洗浄用PBSで洗浄し未吸着の抗原を除去した後、各ウェルの未コート部分を3%スキムミルク含有PBSでブロックした。この各ウェルに各抗MT-MMPモノクローナル抗体それぞれを1μg/wellで加え、室温で約1時間静置した。プレートを洗浄後、2次抗体としてペルオキシダーゼ標識ヤギ抗マウス免疫グロブリンを加えさらに室温で約1時間反応させた。次に基質である過 50

酸化水素とオ-フェニレンジアミンを加え、発色の程度をマイクロプレート用吸光度測定機(MRP-A4、東ソー)を用いて492nmの吸光度で測定した。その結果、表3に示したように、抗MT-MMPモノクローナル抗体は何れも、供試したMT-MMP以外の精製MMPsと反応性を示さなかった。

【0039】

【表1】

ポリペプチド	表 1	
	モノクローン番号	サブクラス/価
A	114-1F2	γ1/κ
	114-2F2	γ1/κ
	114-3U7	γ1/κ
	114-5E4	γ1/κ
	114-6G8	γ1/κ
	114-8D10	γ1/κ
	114-9D3	μ/κ
	114-15E8	γ1/κ
	114-16C11	γ1/κ
	114-18E4	γ1/κ
	114-19F11	γ1/κ
	114-20H5	μ/κ
B	113-1E3	γ3/κ
	113-2E9	γ3/κ
	113-3F6	γ2b/κ
	113-4H7	γ3/κ
	113-5B7	γ3/κ
	113-7C6	γ2b/κ
	113-9C9	γ3/κ
	113-10F2	γ3/κ
	113-13G11	γ3/κ
	113-15E7	γ3/κ
	113-16H8	γ3/κ
	113-17G12	μ/κ
	113-18A10	μ/κ
	113-20G11	γ3/κ
	113-21E3	γ1/κ
	113-25D3	μ/κ
	113-44C1	γ1/κ
	113-46B7	γ1/κ
	113-53G5	μ/κ
	113-63E8	γ1/κ

【0040】

【表2】

表 2

* [0041]
[表3]

ポリペプチド	モノクローン番号	サブクラス/鎖
C	118-3B1	$\gamma 2b/\kappa$
	118-6F3	$\gamma 2b/\kappa$
	118-8D11	$\gamma 1/\kappa$
	118-9B11	$\gamma 1/\kappa$
	118-13D11	α/κ
	118-18C12	$\gamma 1/\kappa$
	118-20A3	$\gamma 2b/\kappa$
	118-25C3	$\gamma 1/\kappa$
	118-26F5	$\gamma 3/\kappa$

10

表 3

モノクローン 番 号	交 差 反 応 性					
	MMP-1	MMP-2	MMP-3	MMP-7	MMP-8	MMP-9
113-5B7	—	—	—	—	—	—
113-15E7	—	—	—	—	—	—
114-1F2	—	—	—	—	—	—
114-2F2	—	—	—	—	—	—
118-3B1	—	—	—	—	—	—

—: 反応せず

【0042】実施例4 遺伝子産物の発現と同定

実施例1(f)で構築したMT-MMP遺伝子をクローン化した組換えpBluescriptからEcoRI切断により挿入断片を切出し、真核細胞用発現ベクターpSG5(Stratagene)のEcoRIサイトにクローニングした。該組換えpSG5をヒト線維芽細胞腫株HT1080にリン酸カルシウム法によりトランスフェクションした。すなわち、蒸留水に20 μ gの組換えpSG5、62 μ lの2M CaCl₂を加え、次に2 \times HBSP溶液(1.5mM Na₂HPO₄、10mM KCl、280mM NaClおよび12mM Glucose含有50mM HEPES緩衝液、pH7.1)をチューブの底に加え全量が1mlになるようにした。これを混合後、室温で30分程度放置し、沈殿形成を十分行った。沈殿をピペッティングにより分散し、HT1080細胞に滴下した後、CO₂インキュベーター中で約4時間インキュベートした。次に培地を除き、15%グリセリン溶液を加え1~3時間処理した後、グリセリンを吸引除去、PBSで洗浄後、³⁵S-メチオニンを含む新鮮な培地を加えた。培養を継続し、細胞タンパク質を³⁵Sで標識した。因みに、HT1080細胞におけるMT-MMP遺伝子の発現はノーザンブロット分析では検出できない。

【0043】細胞を溶解緩衝液(1%Triton X-100、1% bovine hemoglobin、1mMiodoacetamide、0.2U t

rypsin inhibitor、1mM PMSFおよび0.14MNaCl含有0.01M Tris-HCl緩衝液、pH8)中で4℃、1時間インキュベートした。細胞溶解液を遠心分離し、上清を回収した。上清に実施例3で得られたモノクローナル抗体をカップリングさせたセファロース-4B(Pharmacia)を加え、4℃で2時間攪拌しながらインキュベートし、免疫沈降を行った。免疫沈降には実施例3で得られたポリペプチドAに対する12個のモノクローナル抗体のうち非特異的反応性の低いモノクローン番号114-1F2および114-2F2(受託番号FERM BP-4743)の2種類をそれぞれ使用した。次に、遠心分離により免疫沈降させたモノクローナル抗体をカップリングしたセファロース-4Bを沈殿させ、洗浄液(1% Triton X-100、1% bovine hemoglobinおよび0.14M NaCl含有0.01M Tris-HCl、pH8)で3回洗浄し、最後に0.05M Tris-HCl緩衝液、pH6.8で洗浄した。この洗浄したモノクローナル抗体をカップリングしたセファロース-4BにSDSポリアクリルアミド電気泳動用サンプル緩衝液を加え、100℃で5分間加熱した後、SDSポリアクリルアミド電気泳動を行った。泳動後のゲルをX線フィルム(Kodak XR)と重ね70℃で1週間オートラジオグラフィを行った後、現像したX線フィルムをデンストメーターでトレースシグナルの強度を測定した。使用した抗MT

17

—MMPモノクローナル抗体モノクローン番号114-1F2および114-2F2はいずれも、63kDaのタンパク質を免疫沈降した。対照としたMT-MMP遺伝子を含まないベクターpSG5のみをトランスフェクションした細胞では、抗MT-MMPモノクローナル抗体モノクローン番号114-1F2および114-2F2で63kDaタンパク質は免疫沈降されなかった。免疫沈降で検出されたタンパク質の分子量63kDaは、配列表配列番号1に記載したアミノ酸配列から算出される分子量65,78kDaとほぼ一致した。さらに、配列表配列番号1に記載したアミノ酸配列のアミノ酸13位から101位までを欠失した変異体MT-MMP発現プラスミドを作成し、前述と同様HT1080細胞にトランスフェクションし、免疫沈降を行った。変異体MT-MMP遺伝子を導入したHT1080細胞では、63kDaタンパク質は検出されず、55kDaタンパク質を検出した。この分子量は、導入した欠失から予想される分子量と一致した。

【0044】

【実験例】

(a) MT-MMPの発現による潜在型MMP-2の活性化

実施例4で構築したMT-MMP遺伝子をクローン化した組換えpSG5あるいはコントロールとしてベクターpSG5単独を同じく実施例4に記載したリン酸カルシウム法によりHT1080細胞、あるいはマウス胎児由来線維芽細胞NIH3T3にトランスフェクションした。ただし、³⁵S-メチオニン含有新鮮培地の代わりに、通常の新鮮培地を使用した。なお、HT1080細胞およびNIH3T3細胞は、何れも潜在型MMP-2および潜在型MMP-9を分泌して(図6中の66kDaおよび97.4kDaのバンドにそれぞれ相当)、また、MT-MMP遺伝子をトランスフェクションした細胞では、MT-MMPが発現していることを免疫沈降実験により確認した(実施例4参照)。

【0045】得られたトランスフェクタントを無血清培地中で24時間培養し、回収した培養上清をザイモグラフィに供試した。培養上清をSDSポリアクリルアミド電気泳動用緩衝液(非還元)と混和後4℃で一晩放置した後、1mg/mlのカゼイン含有10%ポリアクリルアミドゲルを用い、電流20mA、4℃で電気泳動を行った。泳動終了後、ゲルを2.5%Triton X-100含有ゼラチナーゼ用緩衝液(5mM CaCl₂、1μM ZnSO₄含有Tris-HCl、pH 7.6)で15分間ゆっくり振盪させながら洗浄し、この操作を2回繰り返した。次にゲルを1%Triton X-100含有ゼラチナーゼ用緩衝液中に没し、37℃で一晩放置した。緩衝液を廃棄し、ゲルを0.02%クマシーブリリアントブルーR(50%メタノール-10%酢酸に溶解)で1時間染色後、脱色液(5%メタノール-7.5%酢酸)に没し脱色した。

18

—MMPモノクローナル抗体モノクローン番号114-1F2および114-2F2はいずれも、63kDaのタンパク質を免疫沈降した。対照としたMT-MMP遺伝子を含まないベクターpSG5のみをトランスフェクションした細胞では、抗MT-MMPモノクローナル抗体モノクローン番号114-1F2および114-2F2で63kDaタンパク質は免疫沈降されなかった。免疫沈降で検出されたタンパク質の分子量63kDaは、配列表配列番号1に記載したアミノ酸配列から算出される分子量65,78kDaとほぼ一致した。さらに、配列表配列番号1に記載したアミノ酸配列のアミノ酸13位から101位までを欠失した変異体MT-MMP発現プラスミドを作成し、前述と同様HT1080細胞にトランスフェクションし、免疫沈降を行った。変異体MT-MMP遺伝子を導入したHT1080細胞では、63kDaタンパク質は検出されず、55kDaタンパク質を検出した。この分子量は、導入した欠失から予想される分子量と一致した。

【0046】図6に示すように、MT-MMP遺伝子をトランスフェクションしたHT1080細胞では、新たに64kDaと62kDaのバンドが生じ、潜在型MMP-2の活性化が確認された。この活性化型MMP-2は、細胞を100μg/mlのコンカナバリンAで処理して誘導される活性化型MMP-2分子と同じ分子量を示し、また抗MMP-2モノクローナル抗体と特異的に反応した。この活性化は、ベクター単独をトランスフェクションしたコントロールでは観察されなかった。一方、潜在型MMP-9は、コントロールの細胞と同様に分子量の変化は認められず、活性化は認められなかった。このMT-MMPの発現に伴う潜在型MMP-2の活性化は、MT-MMP遺伝子をトランスフェクションしたNIH3T3細胞でも観察された。

【0047】(b) MT-MMP発現細胞膜画分による潜在型MMP-2の活性化

前項(a)の記載と同様にMT-MMP遺伝子をクローン化した組換えpSG5あるいはコントロールとしてベクターpSG5単独をリン酸カルシウム法によりアフリカミドリザル腎由来細胞COS-1にトランスフェクションした。得られたトランスフェクタントからストロンジン(Strongin)らの方法(ザジャーナル オブ バイオロジカル ケミストリー(J. Biol. Chem.)、第268巻、14033~14039頁(1993))に従い、細胞膜画分を調製した。

【0048】トランスフェクタントをPBSで洗浄後、遠心により細胞を集め8.5%Sucrose)50mM NaCl、10mM N-ethylmaleimide、10μg/ml aprotinin、1μg/ml pepstatin A、1μg/ml leupeptin、1mM phenylmethylsulfonyl fluoride含有25mM Tris-HCl緩衝液(pH 7.4)に懸濁した。細胞懸濁液をDounce homogenizerで破碎し、破碎液を遠心分離(3000×g、10分間、4℃)した。得られた上清をさらに超遠心分離(100,000×g、2時間)し、沈殿を50mM NaCl、10mM N-ethylmaleimide、10μg/ml aprotinin、1μg/ml pepstatin A、1μg/ml leupeptin、1mM phenylmethylsulfonyl fluoride含有25mM Tris-HCl緩衝液(pH 7.4)に懸濁した。この懸濁液を段階的ショ糖密度勾配遠心(20、30、50、60% Sucrose溶液、100,000×g、2時間、4℃)で分離し、生じた細胞膜画分のバンドを回収した。この画分を再度超遠心分離(100,000×g、2時間)により沈殿させた後、0.1mM CaCl₂、0.25% Triton X-100含有25mM HEPES/KOH

(pH7.5)に懸濁し、タンパク質濃度1~2mg/mlとなるように調整した。この懸濁液を超速心分離(100,000/g,1.5時間,4℃)し不溶残渣を除き得られた上清を細胞膜画分とした。

【0049】ベクターpSG5単独またはMT-MMP遺伝子をトランスフェクションしたCOS-1細胞および無処理のCOS-1細胞からそれぞれ調製した細胞膜画分(タンパク質含量20μg)をHT1080細胞の培養上清と37℃で2時間インキュベートした。これら試料を用いて前項(a)に記載したザイモグラフィを行った。その結果、MT-MMP遺伝子をトランスフェクションしたCOS-1細胞由来の細胞膜画分を用いた場合のみ、新たな64kDaと62kDaのバンドが出現し、HT1080細胞の培養上清中に存在する潜在型MMP-2の活性化が観察された(図7参照)。この潜在型MMP-2の活性化は、組換えTIMP-2の添加により阻害された。この結果から、細胞膜上に発現したMT-MMPによる潜在型MMP-2の活性化が示された。

【0050】(c) in vitroにおけるMT-MMP発現による浸潤能の促進
細胞の浸潤能の測定は、ボイデン チャンバー(Boyden Chamber)法(キャンサー リサーチ(Cancer Res.),第47巻,3239~3245頁(1987))を改変して行い、操作はバイオコート マトリゲル インベージョン チャンバー(Becton Dickinson)の操作方法に従った。

【0051】前述の(a)の記載と同様にMT-MMP遺伝子をクローン化した組換えpSG5あるいはコントロールとしてベクターpSG5単独をリン酸カルシウム法によりHT1080細胞、あるいはNIH3T3細胞にトランスフェクションした。これらの宿主細胞はいずれも潜在型MMP-2を分泌している。得られたトランスフェクタンとを0.1%BSA含有DMEM培地に懸濁し、 2×10^5 個の細胞をバイオコート マトリゲル インベージョン チャンバー中の未コートフィルター(ポアサイズ8μm)あるいは予め膨潤させたマトリゲルコートフィルター上に接種した。24時間、37℃炭酸ガスインキュベーター中で培養した後、フィルターを10秒間メタノール中に浸し固定した。次にヘマトキシリンで3分間水洗後、エオジンで10秒間染色し、フィルター下面に浸潤した細胞数を光学顕微鏡下(400倍)で計測した。

【0052】MT-MMP遺伝子をトランスフェクションしたHT1080細胞およびNIH3T3細胞では、いずれもコントロールのベクター単独をトランスフェクションした細胞に比べ、2倍以上の浸潤した細胞が観察された(図8マトリゲル参照)。すなわち、MT-MMPの発現により細胞の浸潤能が上昇したことが示された。また、この測定系に10μg/mlの組換えTIMP-2を添加すると明らかに細胞の浸潤能が抑制されることが認められた(図8 マトリゲル+rTIMP-2参照)。

【0053】

【配列表1】

21

22

配列番号: 1

配列の長さ: 582

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖上

配列の種類: クンバク質

配列

Met	Ser	Pro	Ala	Pro	Arg	Pro	Ser	Arg	Cys	Leu	Leu	Leu	Pro	Leu
1				5					10					15
Leu	Thr	Leu	Gly	Thr	Ala	Leu	Ala	Ser	Leu	Gly	Ser	Ala	Gln	Ser
				20					25					30
Ser	Ser	Phe	Ser	Pro	Glu	Ala	Trp	Leu	Gln	Gln	Tyr	Gly	Tyr	Leu
				35					40					45
Pro	Pro	Gly	Asp	Leu	Arg	Thr	His	Thr	Gln	Arg	Ser	Pro	Gln	Ser
				50					55					60
Leu	Ser	Ala	Ala	Ile	Ala	Ala	Met	Gln	Lys	Phe	Tyr	Gly	Leu	Gln
				65					70					75
Val	Thr	Gly	Lys	Ala	Asp	Ala	Asp	Thr	Met	Lys	Ala	Met	Arg	Arg
				80					85					90
Pro	Arg	Cys	Gly	Val	Pro	Asp	Lys	Phe	Gly	Ala	Glu	Ile	Lys	Ala
				95					100					105
Asn	Val	Arg	Arg	Lys	Arg	Tyr	Ala	Ile	Gln	Gly	Leu	Lys	Trp	Gln
				110					115					120
His	Asn	Glu	Ile	Thr	Phe	Cys	Ile	Gln	Asn	Tyr	Thr	Pro	Lys	Val
				125					130					135
Gly	Glu	Tyr	Ala	Thr	Tyr	Glu	Ala	Ile	Arg	Lys	Ala	Phe	Arg	Val
				140					145					150
Trp	Glu	Ser	Ala	Thr	Pro	Leu	Arg	Phe	Arg	Glu	Val	Pro	Tyr	Ala
				155					160					165

[0054]

【配列表2】

23

24

配列番号: 1 (つづき)

Tyr Ile Arg Glu Gly His Glu Lys Gln Ala Asp Ile Met Ile Phe		
170	175	180
Phe Ala Glu Gly Phe His Gly Asp Ser Thr Pro Phe Asp Gly Glu		
185	190	195
Gly Gly Phe Leu Ala His Ala Tyr Phe Pro Gly Pro Asn Ile Gly		
200	205	210
Gly Asp Thr His Phe Asp Ser Ala Glu Pro Trp Thr Val Arg Asn		
215	220	225
Glu Asp Leu Asn Gly Asn Asp Ile Phe Leu Val Ala Val His Glu		
230	235	240
Leu Gly His Ala Leu Gly Leu Glu His Ser Ser Asp Pro Ser Ala		
245	250	255
Ile Met Ala Pro Phe Tyr Gln Trp Met Asp Thr Glu Asn Phe Val		
260	265	270
Leu Pro Asp Asp Asp Arg Arg Gly Ile Gln Gln Leu Tyr Gly Gly		
275	280	285
Glu Ser Gly Phe Pro Thr Lys Met Pro Pro Gln Pro Arg Thr Thr		
290	295	300
Ser Arg Pro Ser Val Pro Asp Lys Pro Lys Asn Pro Thr Tyr Gly		
305	310	315
Pro Asn Ile Cys Asp Gly Asn Phe Asp Thr Val Ala Met Leu Arg		
320	325	330
Gly Glu Met Phe Val Phe Lys Lys Arg Trp Phe Trp Arg Val Arg		
335	340	345
Asn Asn Gln Val Met Asp Gly Tyr Pro Met Pro Ile Gly Gln Phe		
350	355	360
Trp Arg Gly Leu Pro Ala Ser Ile Asn Thr Ala Tyr Glu Arg Lys		
365	370	375

[0055]

[配列表3]

25

26

配列番号: 1 (つづき)

Asp Gly Lys Phe Val Phe Phe Lys Gly Asp Lys His Trp Val Phe		
380	385	390
Asp Glu Ala Ser Leu Glu Pro Gly Tyr Pro Lys His Ile Lys Glu		
395	400	405
Leu Gly Arg Gly Leu Pro Thr Asp Lys Ile Asp Ala Ala Leu Phe		
410	415	420
Trp Met Pro Asn Gly Lys Thr Tyr Phe Phe Arg Gly Asn Lys Tyr		
425	430	435
Tyr Arg Phe Asn Glu Glu Leu Arg Ala Val Asp Ser Glu Tyr Pro		
440	445	450
Lys Asn Ile Lys Val Trp Glu Gly Ile Pro Glu Ser Pro Arg Gly		
455	460	465
Ser Phe Met Gly Ser Asp Glu Val Phe Thr Tyr Phe Tyr Lys Gly		
470	475	480
Asn Lys Tyr Trp Lys Phe Asn Asn Gln Lys Leu Lys Val Glu Pro		
485	490	495
Gly Tyr Pro Lys Ser Ala Leu Arg Asp Trp Met Gly Cys Pro Ser		
500	505	510
Gly Gly Arg Pro Asp Glu Gly Thr Glu Glu Glu Thr Glu Val Ile		
515	520	525
Ile Ile Glu Val Asp Glu Glu Gly Gly Gly Ala Val Ser Ala Ala		
530	535	540
Ala Val Val Leu Pro Val Leu Leu Leu Leu Leu Val Leu Ala Val		
545	550	555
Gly Leu Ala Val Phe Phe Phe Arg Arg His Gly Thr Pro Arg Arg		
560	565	570
Leu Leu Tyr Cys Gln Arg Ser Leu Leu Asp Lys Val		
575	580	

[0056]

[配列表4]

27
配列番号: 2

* [0057]

配列の長さ: 3403

【配列表5】

配列の型: 核酸

鎖の数: 二本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: cDNA to mRNA

起源

10

生物名: ヒト

組織の種類: 胎盤

*

配列番号: 2 (つづき)

AGTTCAGTGCCTACC GAAGACAAAGGCGCC CCGAGGGAGTGGCGG TGGGACCCAGGCGG 60

TGGGCCCCGCGCGG AGCCACACTGCCCCG CTGACCCCGTGGTCT CGGACCATGTCTCCC 120
MetSerPro

GGCCCAAGACCCTCC CGTTCTCTCCTGCTC CCCCTGCTCAGGCTC GGCACCGCGCTCGCC 180
AlaProArgProSer ArgCysLeuLeuLeu ProLeuLeuThrLeu GlyThrAlaLeuAla

TCCCTCGGCTCGGCC CAAAGCAGCAGCTTC AGCCCCGAAGCCTGG CTACAGCAATATGGC 240
SerLeuGlySerAla GlnSerSerSerPhe SerProGluAlaTrp LeuGlnGlnTyrGly

TACCTGCCTCCCGGG GACCTACCTACCCAC ACACAGCGCTCACCC CAGTCACTCTCAGCG 300
TyrLeuProProGly AspLeuArgThrHis ThrGlnArgSerPro GlnSerLeuSerAla

GCCATCGCTGCCATG CAGAAGTTTACGGC TTGCAACTAACAGGC AAAGCTGATGCAGAC 360
AlaIleAlaAlaMet GlnLysPheTyrGly LeuGlnValThrGly LysAlaAspAlaAsp

ACCATGAAGGCCATG AGGCGCCCCGATGT GGTGTTCCAGACAAG TTTGGGCTGAGATC 420
ThrMetLysAlaMet ArgArgProArgCys GlyValProAspLys PheGlyAlaGluIle

AAGGCCAATGTTTGA AGGAAGCGCTACGCC ATCCAGGCTCTCAAA TGGCAACATAATGAA 480
LysAlaAsnValArg ArgLysArgTyrAla IleGlnGlyLeuLys TrpGlnHisAsnGlu

ATTACTTTCTGCATC CAGAATTACACCCCC AAGGTGGCGGAGTAT GCCACATACGAGGCC 540
IleThrPheCysIle GlnAsnTyrThrPro LysValGlyGluTyr AlaThrTyrGluAla

ATTCCGAAGCGGTTT CCGGTGTGGGAGAGT GGCACCACTGCGC TTCGCGAGGTGCCC 600
IleArgLysAlaPhe ArgValTrpGluSer AlaThrProLeuArg PheArgGluValPro

TATGCCTACATCCGT GAGGGCCATGAGAAG CAGGCCGACATCATG ATCTTCTTTGCCGAG 660
TyrAlaTyrIleArg GluGlyHisGluLys GlnAlaAspIleMet IlePhePheAlaGlu

[0058]

【配列表6】

配列番号: 2 (つづき)

GGCTTCCATGGCGAC	AGCACGCCCTTCGAT	GGTGAGGGCGGCTTC	CTGGCCCATGCCTAC	720
GlyPheHisGlyAsp 185	SerThrProPheAsp 190	GlyGluGlyGlyPhe 195	LeuAlaHisAlaTyr 200	
TCCCCAGGCCCAAC	ATTGAGGAGACACC	CACTTTGACTCTGCC	GAGCCTTGCACTCTC	780
PheProGlyProAsn 205	IleGlyGlyAspThr 210	HisPheAspSerAla 215	GluProTrpThrVal 220	
AGGAATGAGGATCTG	AATGAAATGACATC	TTCCTGCTGGCTGTG	CACGAGCTGGGCCAT	840
ArgAsnGluAspLeu 225	AsnGlyAsnAspIle 230	PheLeuValAlaVal 235	HisGluLeuGlyHis 240	
GCCCTGGGGCTCGAG	CATTCCAGTGACCCC	TGGGCCATCATGGCA	CCCTTTTACCAGTGG	900
AlaLeuGlyLeuGlu 245	HisSerSerAspPro 250	SerAlaIleMetAla 255	ProPheTyrGlnTrp 260	
ATGGACACGGAGAAT	TTTGTCTTCCCGAT	GATGACCGCCGGGGC	ATCCAGCAACTTTAT	960
MetAspThrGluAsn 265	PheValLeuProAsp 270	AspAspArgArgGly 275	IleGlnGlnLeuTyr 280	
GGGGGTGAGTCAGGG	TTCCCCACCAAGATG	CCCCCTCAACCCAGG	ACTACCTCCCGGCCT	1020
GlyGlyGluSerGly 285	PheProThrLysMet 290	ProProGlnProArg 295	ThrThrSerArgPro 300	
TCTGTTCTCGATAAA	CCCAAAAACCCACC	TATGGGCCCAACATC	TGTGACGGGAACTTT	1080
SerValProAspLys 305	ProLysAsnProThr 310	TyrGlyProAsnIle 315	CysAspGlyAsnPhe 320	
GACACCGTGGCCATG	CTCCGAGGGGAGATG	TTTGTCTTCAAGAAG	CGCTGGTTCTGGCGG	1140
AspThrValAlaMet 325	LeuArgGlyGluMet 330	PheValPheLysLys 335	ArgTrpPheTrpArg 340	
GTGAGGAATAACCAA	GTGATCGATGGATAC	CCAATGCCCATTTGGC	CAGTTCTGGCGGGGC	1200
ValArgAsnAsnGln 345	ValMetAspGlyTyr 350	ProMetProIleGly 355	GlnPheTrpArgGly 360	
CTGCCTGCGTCCATC	AACACTGCCTACGAG	AGGAAGGATGGCAAA	TTCGTCTTCTTCAAA	1260
LeuProAlaSerIle 365	AsnThrAlaTyrGlu 370	ArgLysAspGlyLys 375	PheValPhePheLys 380	
GGAGACAAGCATTGG	GTGTTTGATGAGGCG	TCCCTGGAACCTGGC	TACCCCAAGCACATT	1320
GlyAspLysHisTrp 385	ValPheAspGluAla 390	SerLeuGluProGly 395	TyrProLysHisIle 400	

[0059]

【配列表7】

31

32

配列番号: 2 (つづき)

AAGGAGCTGGGCGGA LysGluLeuGlyArg 405	GGGCTGCCTACCGAC GlyLeuProThrAsp 410	AAGATTGATGCTGCT LysIleAspAlaAla 415	CTCTTCTGGATGCCC LeuPheTrpMetPro 420	1380
AATGGAAAGACCTAC AsnGlyLysThrTyr 425	TICTTCCGTGGAAAC PhePheArgGlyAsn 430	AAGTACTACCGTTTC LysTyrTyrArgPhe 435	AACGAAGAGCTCAGG AsnGluGluLeuArg 440	1440
GCAGTGGATAGCGAG AlaValAspSerGlu 445	TACCCCAAGAACATC TyrProLysAsnIle 450	AAAGTCTGGGAAGGG LysValTrpGluGly 455	ATCCCTGAGTCTCCC IleProGluSerPro 460	1500
AGAGGGTCATTTCATC ArgGlySerPheMet 465	GGCAGCGATCAAGTC GlySerAspGluVal 470	TTCACCTTACTTCTAC PheThrTyrPheTyr 475	AAGGGGAACAAATAC LysGlyAsnLysTyr 480	1560
TGGAATTCAACAAC TrpLysPheAsnAsn 485	CAGAAGCTGAAGGTA GlnLysLeuLysVal 490	GAACCGGGCTACCCC GluProGlyTyrPro 495	AAGTCAGCCCTGAGG LysSerAlaLeuArg 500	1620
GA CTGGATGGGCTGC AspTrpMetGlyCys 505	CCATCGCGAGGCCGG ProSerGlyGlyArg 510	CCGGATGAGGGGACT ProAspGluGlyThr 515	GAGGAGGAGACGGAG GluGluGluThrGlu 520	1680
GTGATCATCATTGAG ValIleIleIleGlu 525	GTGGACGAGGAGGGC ValAspGluGluGly 530	GGCGGGCGGTGAGC GlyGlyAlaValSer 535	GCGGCTGCCGTGCTG AlaAlaAlaValVal 540	1740
CTGCCCCTGCTGCTG LeuProValLeuLeu 545	CTGCTCCTGGTGCTG LeuLeuLeuValLeu 550	GCGGTGGGCCITGCA AlaValGlyLeuAla 555	GTCTTCTTCTTCAGA ValPhePhePheArg 560	1800
CGCCATCGGACCCCC ArgHisGlyThrPro 565	AGCGGACTGCTCTAC ArgArgLeuLeuTyr 570	TGCCAGCGTCCCTG CysGlnArgSerLeu 575	CTGGACAAGGTCTGA LeuAspLysVal... 580	1860
CGCCCATCGCCCGGC CGCCCACTCTCTACC ACAAGGACTTTGCCT	CGCCCACTCTCTACC ACAAGGACTTTGCCT	CTGAAGGCCAGTGGC		1920
AGCAGGTGGTGGTGG GTGGGCTGCTCCCAT	CGTCCCGAGCCCCCT	CCCCGCAGCCTCCTT		1980

[0060]

【配列表8】

33

34

配列番号: 2 (つづき)

GCTTCTCTCTGCCC CTGGCTGGCCTCCTT CAGCCTGACCGCCTC CCTCCCTCCTGCCCC	2040
GGCATTGCATCTTCC CTAGATAGGTCCCT GAGGGCTGAGTCCCA GGGCGGCCCTTTCCA	2100
GCCTTCCCCCTCAG GGGAAOCTGTAGCT TTGTGTCTGTCCAGC CCCATCTGAATGTGT	2160
TGGGGGCTCTGCACT TGAAGGCAGGACCT CAGACCTCGCTGGTA AAGGTCAAATCGGT	2220
CATCTGCTCTTTTC CATCCCTGACATAC CTTAAOCTCTGAAT CTGACCTCAGGAGCC	2280
TCTGGGAACTCCAG CCCTGAAAGCCGAG GTGTADCAATTGGC AGCCTCTCACTACTC	2340
TTTCTGGCTAAAAGC AATCTAATCTTGTG AGGGTAGAGCCCTG AGACAGTGTGAGGGG	2400
GTGGGACTGCCAAG CCACCCTAAGACCTT GCGAGGAAACTCAG AGAGGGCTCTTCGTTG	2460
CTCACTCAGTCAAGT TCCTCGGAGATCTT CTTGCTCCTACCTAC CCCAGGGAATTCGA	2520
AGGAAGGAGCCTGAG CCACTGGGACTAAG TGGGCAGAAGAAAC CTTGGCAGCCCTGTG	2580
CCTCTCGAATGTTAG CCTTGGATGGGGCTT TCACACTTAGAAGAG CTGAAACCAGGGGTG	2640

【0061】

【配列表9】

35
配列番号: 2 (つづき)

CAGCTCTCAGTAGG GTGGGCCCCGTGGCA GAGCCCCGGTCAGA GCGCTGGGGGTGAGC 2700

CTTAAGCCACAGAG AAAGAACCCTTGCCCA AATCAGGCAGCTGC GCGTGAGGCCAAAC 2760

GCAGAACAGCCAGAG GGGGCAGGAGGGGAC CAAAACGAAATGA GCACGTGCAGCAGCA 2820

TTCGAAGGCTGGGGC CCGGCAGCCAGGTTA AAGCTAACAGGGGC CATCAGGCTGGCCTT 2880

GTGAGCTCTCAGGA AGGGCCCTGAGGAAG GCACACTTGCTCCTG TTGCTGCTGTCCTT 2940

GCTGCCCAGGCAGGG TGGAGGGGAAGGCTA GGGCAGCCACAGAAA GGAGCAGAGAGGCA 3000

CACAAACGAGGAATG AGGGGCTTCACGAGA GCCACAGGGGCTGG CTGCCCACGCTGTCC 3060

CGGCCTGCTCACCAT CTCAGTGAGGGACAG GAGCTGGGGCTGCTT AGGCTGGGTCCACGC 3120

TTCCTGCTGCCAGC ACCCTCAAGGCTGT CTCACCACTGGGCTG CCGCTGCTGCTCCCC 3180

ACCCAGCCACCCAT TGAAGTCTCCTTGGG TCCCAAGCTGGGCA TGGTACCAGGACTT 3240

GGGAGCTGAGACCC AGTGCAGGGAGCAAG AGGAGAGGATGTGG GGGGCTGGGGACGG 3300

GTAGGGGAAATGGCG TGAACGGTGCTGGCA GTTCGGCTAGATTTC TGTCTTGTGTTTT 3360

TTTGTTTTGTTTAAAT GTATACTTTTATTAT AATTATTATAT

【0062】

30 【配列表11】

【配列表10】

配列番号: 3

配列の長さ: 7

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

フラグメント型: 中間部フラグメント

40

配列

Pro Arg Cys Gly Val Pro Asp

1

5

37

38

配列番号: 4

配列の長さ: 9

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

フラグメント型: 中間部フラグメント

配列

Gly Asp Ala His Phe Asp Asp Asp Glu

1

5

【配列表12】

配列番号: 5

配列の長さ: 20

配列の型: 核酸

鎖の数: 二本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸 合成DNA

配列

CCC(C/A)(C/A)G(C/A/C)TC(T/C)(C/G) G(C/A/C)(G/A)(A/T)(G/C/T)CC(T/A)GA
 【0063】 【配列表13】

配列番号: 6

配列の長さ: 25

配列の型: 核酸

鎖の数: 二本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸 合成DNA

配列

(T/C)TC(G/A)T(G/C)(G/A/C)TC(G/A) TC(G/A)AA(G/A)TG(G/A)(G/A)
 (C/A/T)(G/A)TC(T/C)

【配列表14】

39

40

配列番号: 7

配列の長さ: 27

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

フラグメント型: 中間部フラグメント

配列

Gly Gly Gly Ala Val Ser Ala Ala Ala Val Val Leu Pro Val Leu

1 5 10 15

Leu Leu Leu Leu Val Leu Ala Val Gly Leu Ala Val Phe Phe Phe

20 25

【配列表15】

配列番号: 8

配列の長さ: 14

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

配列

Arg Glu Val Pro Tyr Ala Tyr Ile Arg Glu Gly His Glu Lys

1 5 10

【0064】

【配列表16】

配列番号: 9

配列の長さ: 14

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

配列

Asp Gly Asn Phe Asp Thr Val Ala Met Leu Arg Gly Glu Met

1 5 10

【配列表17】

配列番号: 10

配列の長さ: 15

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

配列

Pro Lys Ser Ala Leu Arg Asp Trp Met Gly Cys Pro Ser Gly Gly

1

5

10

15

【図面の簡単な説明】

【図1】MT-MMPのアミノ酸配列のカイト・ドール法による親水性、疎水性分布図である。

【図2A】MT-MMPのアミノ酸配列と公知のMMPファミリー(MMP-1、MMP-2、MMP-3、MMP-7、MMP-8、MMP-9、MMP-10、MMP-11)のアミノ酸配列との配列上の相同性を比較した図である。各図中の記号は、それぞれアミノ酸を表し、AはAla、CはCys、DはAsp、EはGlu、FはPhe、GはGly、HはHis、IはIle、KはLys、LはLeu、MはMet、NはAsn、PはPro、QはGln、RはArg、SはSer、TはThr、VはVal、WはTrp、YはTyrに対応する。これらの2A~2Hの図は一体となって1つの図を構成する。

【図2B】MT-MMPのアミノ酸配列と公知のMMPファミリー(MMP-1、MMP-2、MMP-3、MMP-7、MMP-8、MMP-9、MMP-10、MMP-11)のアミノ酸配列との配列上の相同性を比較した図である。各図中の記号は、それぞれアミノ酸を表し、AはAla、CはCys、DはAsp、EはGlu、FはPhe、GはGly、HはHis、IはIle、KはLys、LはLeu、MはMet、NはAsn、PはPro、QはGln、RはArg、SはSer、TはThr、VはVal、WはTrp、YはTyrに対応する。これらの2A~2Hの図は一体となって1つの図を構成する。

【図2C】MT-MMPのアミノ酸配列と公知のMMPファミリー(MMP-1、MMP-2、MMP-3、MMP-7、MMP-8、MMP-9、MMP-10、MMP-11)のアミノ酸配列との配列上の相同性を比較した図である。各図中の記号は、それぞれアミノ酸を表し、AはAla、CはCys、DはAsp、EはGlu、FはPhe、GはGly、HはHis、IはIle、KはLys、LはLeu、MはMet、NはAsn、PはPro、QはGln、RはArg、SはSer、TはThr、VはVal、WはTrp、YはTyrに対応する。これらの2A~2Hの図は一体となって1

つの図を構成する。

【図2D】MT-MMPのアミノ酸配列と公知のMMPファミリー(MMP-1、MMP-2、MMP-3、MMP-7、MMP-8、MMP-9、MMP-10、MMP-11)のアミノ酸配列との配列上の相同性を比較した図である。各図中の記号は、それぞれアミノ酸を表し、AはAla、CはCys、DはAsp、EはGlu、FはPhe、GはGly、HはHis、IはIle、KはLys、LはLeu、MはMet、NはAsn、PはPro、QはGln、RはArg、SはSer、TはThr、VはVal、WはTrp、YはTyrに対応する。これらの2A~2Hの図は一体となって1つの図を構成する。

【図2E】MT-MMPのアミノ酸配列と公知のMMPファミリー(MMP-1、MMP-2、MMP-3、MMP-7、MMP-8、MMP-9、MMP-10、MMP-11)のアミノ酸配列との配列上の相同性を比較した図である。各図中の記号は、それぞれアミノ酸を表し、AはAla、CはCys、DはAsp、EはGlu、FはPhe、GはGly、HはHis、IはIle、KはLys、LはLeu、MはMet、NはAsn、PはPro、QはGln、RはArg、SはSer、TはThr、VはVal、WはTrp、YはTyrに対応する。これらの2A~2Hの図は一体となって1つの図を構成する。

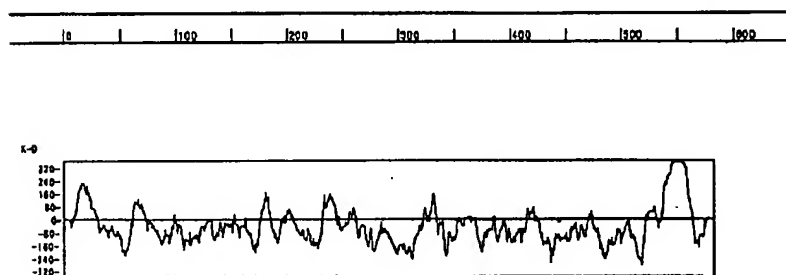
【図2F】MT-MMPのアミノ酸配列と公知のMMPファミリー(MMP-1、MMP-2、MMP-3、MMP-7、MMP-8、MMP-9、MMP-10、MMP-11)のアミノ酸配列との配列上の相同性を比較した図である。各図中の記号は、それぞれアミノ酸を表し、AはAla、CはCys、DはAsp、EはGlu、FはPhe、GはGly、HはHis、IはIle、KはLys、LはLeu、MはMet、NはAsn、PはPro、QはGln、RはArg、SはSer、TはThr、VはVal、WはTrp、YはTyrに対応する。これらの2A~2Hの図は一体となって1つの図を構成する。

【図2G】MT-MMPのアミノ酸配列と公知のMMP

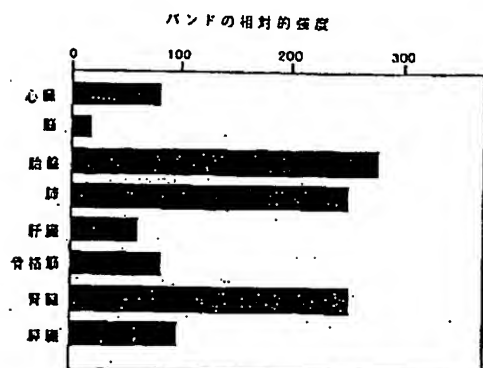
ファミリー (MMP-1、MMP-2、MMP-3、MMP-7、MMP-8、MMP-9、MMP-10、MMP-11) のアミノ酸配列との配列上の相同性を比較した図である。各図中の記号は、それぞれアミノ酸を表し、AはAla、CはCys、DはAsp、EはGlu、FはPhe、GはGly、HはHis、IはIle、KはLys、LはLeu、MはMet、NはAsn、PはPro、QはGln、RはArg、SはSer、TはThr、VはVal、WはTrp、YはTyrに対応する。これらの2A~2Hの図は一体となって1つの図を構成する。

【図2H】MT-MMPのアミノ酸配列と公知のMMPファミリー (MMP-1、MMP-2、MMP-3、MMP-7、MMP-8、MMP-9、MMP-10、MMP-11) のアミノ酸配列との配列上の相同性を比較した図である。各図中の記号は、それぞれアミノ酸を表し、AはAla、CはCys、DはAsp、EはGlu、FはPhe、GはGly、HはHis、IはIle、KはLys、LはLeu、MはMet、NはAsn、PはPro、QはGln、RはArg、SはSer、TはThr、VはVal、WはTrp、YはTyrに対応する。これらの2A~2Hの図は一体となって1つの図を構成する。

【図1】



【図3】



【図3】ノーザンブロット分析による各種のヒト組織中のMT-MMP mRNAの発現を相対的に示したものである。

【図4】ノーザンブロット分析によるヒト肺扁平上皮癌2例の正常部および癌部におけるMT-MMP mRNAの発現を相対的に示したものである。

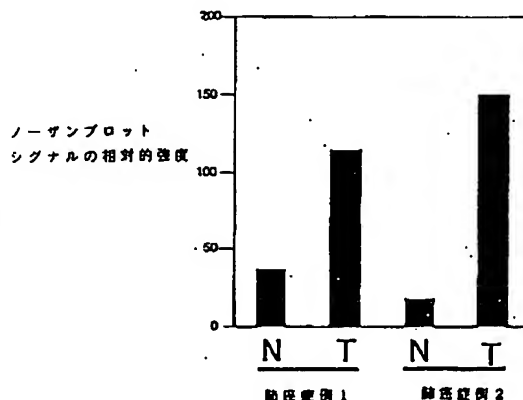
【図5】MT-MMP cDNA導入HT1080細胞中で発現したMT-MMPタンパク質を免疫沈降法により検出した結果を示したものである。図はデンストメータによるスキャンを示したものであり、黒塗り部分が抗MT-MMPモノクローナル抗体で免疫沈降したMT-MMPの位置を示す。

【図6】MT-MMP cDNA導入HT1080細胞およびMT-MMP cDNA導入NIH3T3細胞の培養上清のザイモグラフィーにより、MT-MMPの発現による潜在型MMP-2の活性化を示したものである。

【図7】MT-MMP cDNA導入COS-1細胞の細胞膜画分による潜在型MMP-2の活性化をザイモグラフィーにより示したものである。

【図8】MT-MMPの発現による細胞の浸潤能の促進を一部改変したボーデン チャンバー (Boyden Chamber) 法により示したものである。

【図4】



【図2A】

MMP-11	MAPAAHLRSA	AARALLPPL	LLLLQPPPL	LARA	33
MMP-1	MHS	FPPL	LLLLFHVVS	HSFPATLETQ	EQDVLVQKY	37
MMP-8	MFSLKTL	PPL	LLLVQISKA	FPVSSKEKNT	KTVQD	36
MMP-10	MMHL	AFL	VLLCLPVCSA	YPLSGAAKEB	OSNKDLAQY	37
MMP-3	NKSL	PIL	LLLCVAVCSA	YPLDGAARGE	OTSMNLVQKY	37
MMP-9	MSLWQP	LVLVLLV	LGCCFAAPRQ	RQSTLVLPFG	DLRTNLTDRQ	43
MMP-2	AP	SPIIKFPO	DVAPK	19
MMP-7	MR	LTVLCAY	CLLPGLALP	LPQEGGHE	33
MT-MMP	MSPAP	RPSR	CLLPPLTLG	TALASLOSAQ	SSSPS	38
Consensus	M	P.L	LLL	50
MMP-11	LPPDVHKL	HAERR	Q	QPMHAAALPS	SP	74
MMP-1	L-EKYYNLKN	DORQVEKRRN	SGPVVEKLKQ	MQEFFGLKVT	GKPDATLKV	86
MMP-8	L-EKYYQLPS	NQYQSTRKNO	TNVIVEKLKE	MQRFFGLNVT	GKPNETLDM	85
MMP-10	L-EKYYNLEK	DVKQFRRK	D	SNLIVKKIQQ	MQKFLGLEVT	GKLDOTLEV	85
MMP-3	L-ENYYDLKK	DVKQFVRRKD	SOPVVKKIRE	MQKFLGLEVT	GKLDOTLEV	86
MMP-9	LAEYLYRYG	YTRVAEMRGE	SKSLPALLL	LQKQLSLPET	GELDSATLKA	93
MMP-2	LAVQYLNTP	YGCPE	SCN	LFVLKDTLKK	MQKFFGLPQT	ODLDQNTIET	67
MMP-7	QAQDYLRKF	YLYDSETK	N	ANSLEAKLKE	MQKFFGLPIT	GMLNSRVIEI	81
MT-MMP	L-QQYGYLPP	CDLRHTQBS	QSLSAATAA	MQKFFGLQVT	GKADADTKA	87
Consensus	L-E-Y-L	E	KL	MQK7, GL, VT	100

【図2B】

MMP-11	LRPPRCGVPO	PSDGLSARN	RQKRFLVSGG	RWEKTDLTyr	ILRFPHQLVQ	123
MMP-1	MKQPRCGVPO	VAQ	FVL	TE-GNP	127
MMP-8	MKKPRCGVPO	SGG	FML	TP-GNP	126
MMP-10	MRKPRCGVPO	VGH	FSS	FP-GMP	126
MMP-3	MRKPRCGVPO	VGH	FRT	FP-GIP	127
MMP-9	MRTPRCGVPO	LGR	FQT	FE-ODL	134
MMP-2	MRKPRCONPD	VAN	YNF	FP-RKP	108
MMP-7	MQKPRCGVPO	VAE	YSL	FP-NSP	122
MT-MMP	MRRPRCGVPO	KFGAEIKANV	RRKRYAIQGL	KWQHNEITFC	IQNYTPKVGE	137
Consensus	MRKPRCGVPO	VG	F	FP-G.P	150
MMP-11	EQVROTMAEA	LKVWSDVTPL	TFTEV	HEGRADI	165
MMP-1	ADVDHAIKA	FQLWSNVTP	TFTKV	SEQQADI	169
MMP-8	AEVERAIKDA	FELWSVASPL	IFTRI	SQGEADI	168
MMP-10	DAVDSAIKA	LKVWEEVTPL	TFSRL	YEOEADI	168
MMP-3	DAVDSAVEKA	LKVWEEVTPL	TFSRL	YEOEADI	169
MMP-9	AVIODAFARA	FALWSAVTPL	TFTRV	YSRDADI	176
MMP-2	ETVDDAFARA	FQVWSDVTPL	RFSRI	HQGEADI	150
MMP-7	ITVDRLVSKA	LNMWKEIPL	HFRKV	VWGTADI	164
MT-MMP	YATYEAIRKA	FRVYESATPL	RFREVPYAYI	REGHEKQADI	MIFFAEGFHC	187
Consensus	..VD.A..KA	F.VHS.VTPL	TF.RV	EG.ADI	200

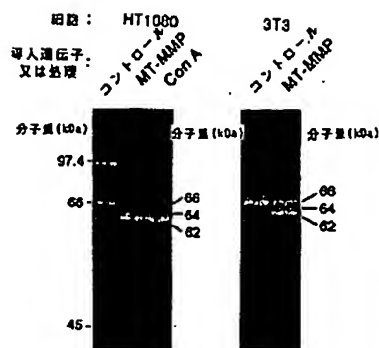
【図2C】

MMP-11	ODLPFDGPGG	ILAHAFPPKT	HREGDVHFDY	OETWTICDQ	GTO.....	208
MMP-1	DNSPFDGPGG	NLAHAFQPGP	GIGGDAHFDE	HERWTNNFT	EYN.....	211
MMP-8	DNSPFDGPGG	ILAHAFQPGQ	QIGGDAHFOA	ESTWTNTSA	NYN.....	210
MMP-10	DFYSFDGPGH	SLAHAYPPGP	OLYQDINHFD	DEKMTEDAS	GTN.....	210
MMP-3	DFYFPDGPGR	VLAHAYAPGP	QINGDAHFDD	DEQWTKDIT	GTN.....	211
MMP-9	DGYFPDGKDG	LLAHAFPPGP	QIGGDAHFDD	DELWSLQKQ	VVPTRFGNA	225
MMP-2	DGYFPDGKDG	LLAHAFAPGT	GVGGDSHFDD	DELMTLQEG	QVVRVKYGNA	199
MMP-7	DSYFPDGPGR	TLAHAFAPGT	GLGGDAHFDE	DERWTDGSSL	GIN.....	207
MT-MMP	DSTPFDGEGG	FLAHAYFPGP	NIGGDTHFDS	AEPHTVRNE	DLN.....	229
Consensus	D.YPFDGPGG	.LAHAF.PGP	QIGGDAHFDD	DE.WT.....	.N.....	250
MMP-11	208
MMP-1	211
MMP-8	210
MMP-10	210
MMP-3	211
MMP-9	DGAACHFFFI	FEGRSYSACT	TDGRSDGLPW	CSTTANYDTD	DRFQFCPSER	275
MMP-2	DOEYCKFPFL	FNGKEYNSCT	DTGRSDGLFW	CSTTYNFEKO	QKYQFCPHEA	249
MMP-7	207
MT-MMP	229
Consensus	300

【図2D】

MMP-11	208
MMP-1	211
MMP-8	210
MMP-10	210
MMP-3	211
MMP-9	LYTRDGNADG	KPCQFPFIFQ	QQSYSACTTD	GRSDGYRWCA	TTANYDRDKL	325
MMP-2	LFTMGGNAEG	QPCKFPPFRFQ	QTSYDSCTTE	GRSDGYRWCG	TTEDYDRDKK	299
MMP-7	207
MT-MMP	229
Consensus	350
MMP-11	208
MMP-1	211
MMP-8	210
MMP-10	210
MMP-3	211
MMP-9	FGFCPTRADS	TVMGONSAGE	LCVFPFTFLQ	KEYSTCTSEQ	RQDGLWCAT	375
MMP-2	YGFCPETAMS	TVGG-NSEGA	PCVFPFTFLG	NKYESTCTSAQ	RSDQKWCAT	348
MMP-7	207
MT-MMP	229
Consensus	400

【図6】



【図2 E】

MMP-11L	LQVAA-HEFG	HVLGLQHTTA	AKALMSAFY	237	
MMP-1L	HRVAA-HELO	HSLGLSHSTD	IOALMYPSTY	240	
MMP-8L	FLVAA-HEFG	HSLGLAHSSD	PGALMYPNY	239	
MMP-10L	FLVAA-HELO	HSLGLPHSAN	TEALMYPLYN	240	
MMP-3L	FLVAA-HEIG	HSLGLPHSAN	TEALMYPLYN	241	
MMP-9	TSNFDSDKKW	GFCPDQGYSL	FLVAA-HEFG	HALGLDKSSV	PEALMYPNY	423
MMP-2	TANYDDDRKW	GFCPDQGYSL	FLVAA-HEFG	HAMGLEHSSQ	PGALMAPIY	396
MMP-7	FLYAAHTELQ	HSLGMHSSD	PNAMMYPTY	236	
MT-MMPGKDI	FLVAV-HELQ	HALGLEHSSD	PSAIMAPFY	261	
ConsensusL	FLVAA-HE.O	HSLGL.HS.D	P.ALMPY.Y	450	
MMP-11	TF..RYPLSL	SPDDCRGVQH	LYG.....	258	
MMP-1	TF..SQDVQL	AQDDIDGIQA	IYG.....	261	
MMP-8	AFRETSNYSL	PQDDIDGIQA	IYG.....	262	
MMP-10	SFTELAQFRL	SQDDVNGIQS	LYG.....	263	
MMP-3	SLTDLTRFRL	SQDDINGIQS	LYG.....	264	
MMP-9	RF..TEGPPL	HKDDVNGIRH	LYGPRPEPEP	RPPTTTTPQ	TAPPTVCPTG	471
MMP-2	TY..TKNFRL	SQDDIKGIEQ	LYG.....	417	
MMP-7	CNGDQNFKL	SQDDIKGIEQ	LYGKRSNRK	X.....	267	
MT-MMP	QWMDTENFVL	PODDRRGICQ	LYGQESQPT	KMPQPRPTS	RPSVPDKPKM	311
Consensus	.F.....F.L	SQDDI.GIQ...	LYG.....	500	

【図2 F】

MMP-11QPW	PTVTSRTPAL	GPOAQIDTNE	IAPLEPDAPP	291	
MMP-1	RSQNPPVQ-P	GPQTP.....KAC	278	
MMP-8LSSNP-I	QPTGP...ST	P.....KPC	279	
MMP-10P	PPASTEEL-P	VPTKS...VP	S-GSEMPAKC	289	
MMP-3P	PPDSPETP-L	VPTEP...VP	P-EPGTPANC	290	
MMP-9	PPTVMPSERP	TAGTGPFFSA	GPTGPPTA-Q	PSTAT...TV	PLSPYD-QAC	516
MMP-2ASPD-I-D	LGTGP...TP	TLGPVTPTEIC	440	
MMP-7	267	
MT-MMP	PTYGPNICDG	NFDTVANLRG	EMPVEKKRWF	WRVRNNOVMD	GYPMPIGQFW	361
ConsensusP..	..PT.....C	550	
MMP-11	DACEASFDAY	STIR-GEILF	FKAGFVWRLR	GGQL-QPGYP	ALASRHWOQL	339
MMP-1	DS-KLTFDAI	TTIR-GEVMF	FKDRFYMR-T	NPFY-PEVEL	NFTSVFWPQL	324
MMP-8	OP-SLTFDAI	TTLR-GEILF	FKDRFYMR-R	HPQL-QRVEM	NFISLFWPSL	325
MMP-10	OP-ALSFDAI	STLR-GEYLF	FKDRFYMR-R	SHWN-PEPEF	NLISAFWPSL	335
MMP-3	OP-ALSFDAY	STLR-GEILI	FKDRFYMR-K	SLRK-LEPEL	NLISFWPSL	336
MMP-9	NV-NI-FDAI	AEIG-NQLYL	FKDGKYWRFS	EOROSRPQGP	FLIADKWPAL	563
MMP-2	KQ-DIVFDGI	AQIR-GEIFF	FKDRFYWRTV	TPRD-KPMCP	LLVATFWPEL	487
MMP-7	267	
MT-MMP	RGLPASINTA	YERKDGKFFV	FKGDKHWVFD	EASLEPGYPK	HIKELQRL-L	410
Consensus	D.....FDAI	.T.R-GE..F	FKDR..WR..L.S.FWP.L	600

【図2 G】

MMP-11	P-SPVDAAFE	DAQGHWWF	QGAQYVYDQ	EKPVLG...	APL-TELGLV	383
MMP-1	P-NGLEAAFE	FADREVRFF	KGNKYWAVQ	QNVLHG...	KDIYSSFOFP	371
MMP-8	P-TGIAAAFE	DFORLIFLF	KGNQYHALSG	YDILQG...	KDI-SNYGFP	371
MMP-10	P-SYLDAAFE	VNSRDTVFIF	KGNFWAIRG	NEVQAG...	RGI-HTLGFP	381
MMP-3	P-SGVDAAFE	VTSKLVFIF	KGNQFWAIRG	NEVRAQ...	RGI-HTLGFP	382
MMP-9	P-RKLDVFE	EPLSKKLF	SGROVWVYTG	ASV-LG...	RRL-DKLG	607
MMP-2	P-EKIDAVFE	APQEEKAVFF	AGNEYWYSA	STLERG...	KPL-TSLGLP	513
MMP-7	267
MT-MMP	PTDKIDAAAF	WMPNGKTYFF	RGNKYRFNE	ELRAVDSEYP	KNIXVMEGIP	460
Consensus	P...DAAYEPF	.GN.YW...GD...YP	..I...LG.P	650

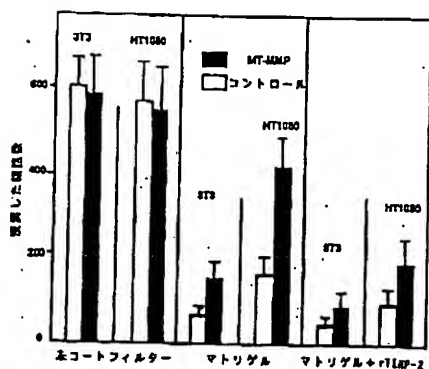
MMP-11	R-FFVHAAL	VWGPEKNKIY	FFBORDYWRP	HPSTRVDSF	VPRRATOWRG	431
MMP-1	RTVKHIDAA	S-EENTOKTY	FFVANKYWRP	DEYKRSMDPO	YPKMIAHDFP	420
MMP-8	SSVQAIDAA	F---YRSKTY	FFVNDQFWRY	DNQRQFMEPG	YPKSISGAFF	418
MMP-10	PTIRKIDAA	S-DKEKKKTY	FFAADKYWRP	DENSQSMEOG	FPRLIADDFP	430
MMP-3	PTVRKIDAA	S-DKEKNKTY	FFVEOKYWRP	DEKRNHMEPG	FPKQIAEDFP	431
MMP-9	ADVAQVTGAL	R-SGRCKM-L	LFSORRLWRP	DVKAQMVDP	SASEVDRMFP	655
MMP-2	PDVQRVDAAF	N-WSKNKTY	IFAGDKFWRY	NEVKKKMDPG	FPKLIAOAWN	582
MMP-7	267
MT-MMP	ESFRGSFNG	SDEVFTYFYK	GKNYWKFNQ	KLKVEPGYPK	SALRDWNGCP	509
Consensus	..V...DAAKTY	FF...K.WR	D.....M.PG	.P..I...FP	700

【図2 H】

MMP-11	VPSE-IDAA	FQDADGYAYF	LRGRLYWKFD	PVKVKALEGF	PRLV-.....	473
MMP-1	GIGH-KVDA	V-FMKDGFYF-FH	GTRQYKFDPK	TKRIILTQ..	458
MMP-8	GIES-KVDA	V-FQGEHFFHV-FS	OPRYATDLI	AQRVTRVA..	456
MMP-10	GVEP-KVDA	V-LQAFGFYF-FS	GSSQFEFDPN	ARKVTHIL..	468
MMP-3	GIDS-KIDA	V-FEETGFFYF-FH	GSSQLEFDPN	AKKVTHIL..	469
MMP-9	GVPL-DTHD	VFYREKAYFCQDR-FY	WRVSSRSSELN	QVDQVGVV..	697
MMP-2	AIPD-NLDA	VVDLQGGGHS-YF	FKGAYVLKLE	N-QSLKSVKF	621
MMP-7	267
MT-MMP	SGORFDEGTE	EETEVIIEV	DEEGGGAVSA	AAVVLPLVLL	LLVLAVGLAV	559
Consensus	G.....DA	V.....FF	750

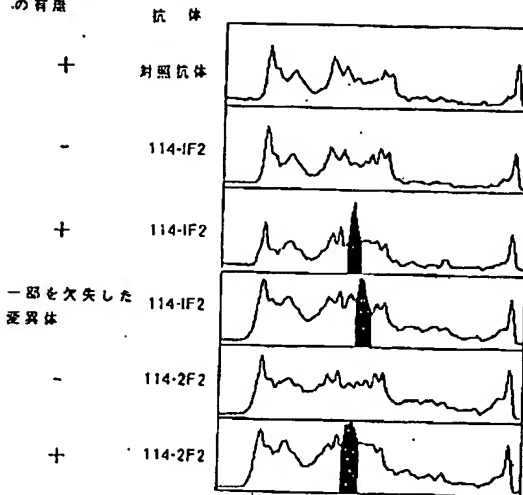
MMP-11	..CPD-FFG	CAE.....PA	NTFLX.....	489
MMP-1	..KANSVTH	CR.....KN	469
MMP-8	..RONKVLN	CRY.....GX	468
MMP-10	..KSNSVLH	C.....	476
MMP-3	..KSNSVLN	C.....	477
MMP-9	..TYD-ILQ	CPE.....DX	708
MMP-2	GSIKSD-WLO	C.....	631
MMP-7	267
MT-MMP	FFRRRHGTPR	RLLYCQSRLL	DKV.....	582
ConsensusWL	C.....	796

【図8】

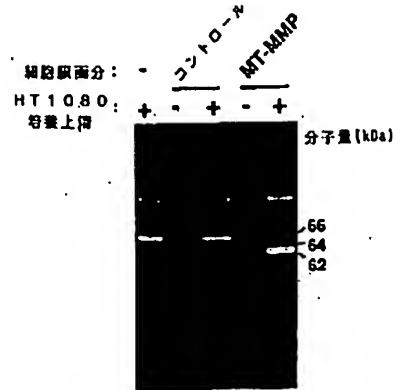


【図5】

MT-MMP cDNAによる
トランスフェクション
の有無



【図7】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. 6	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 1/21	ZNA	8828-4B		
15/09				
C 1 2 P 21/08		9161-4B		
G 0 1 N 33/53		D		
33/573		A		
33/574		Z		
33/577		B		
// A 6 1 K 39/395	P			
(C 1 2 N 9/64				
C 1 2 R 1:19)				
(C 1 2 N 1/21				
C 1 2 R 1:19)				
(C 1 2 P 21/08				
C 1 2 R 1:91)				